

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-082556

(43)Date of publication of application : 28.03.1995

(51)Int.Cl.

C09K 15/34  
C09B 61/00  
C12P 23/00  
//(C12P 23/00  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 05-252582

(71)Applicant : SOGO BIYU IKAGAKU KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 14.09.1993

(72)Inventor : MAOKA TAKASHI  
MATSUMURA AKIHIKO  
ITO YOSHIHIRO  
MOCHIDA KOICHI

(54) EXTRACT THAT CONTAINS CAROTENOID HAVING ANTIOXIDANT ACTIVITY, ITS PRODUCTION, ANTIOXIDANT, AND COLORING MATTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a highly safe natural antioxidant or coloring matter by extracting a bacterium that produces a carotenoid having antioxidant activity and belongs to the genus Rhodobacter with an organic solvent.

CONSTITUTION: A bacterium that produces a carotenoid and belongs to the genus Rhodobacter is inoculated into a medium comprising yeast extract, polypeptone, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> and water and cultured at 30-40° C for about 48hr to obtain a bacterium that produces a carotenoid having antioxidant activity and belongs to the genus Rhodobacter. The bacterium is extracted with an organic solvent such as ethanol, methanol or acetone, and the extract is concentrated to obtain a carotenoid-containing extract.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 23.08.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-82556

(43) 公開日 平成7年(1995)3月28日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 9 K 15/34

C 0 9 B 61/00

C 1 2 P 23/00

// (C 1 2 P 23/00

C 1 2 R 1:01)

A

9452-4B

審査請求 未請求 請求項の数12 F D (全 10 頁)

(21) 出願番号

特願平5-252582

(22) 出願日

平成5年(1993)9月14日

(71) 出願人 593033533

株式会社総合美容医科学研究所

東京都目黒区下目黒3丁目7番10号

(72) 発明者 眞岡 孝至

京都府京都市山科区厨子奥矢倉町29 山本  
光雄方

(72) 発明者 松村 昭彦

東京都港区白金2丁目5番51-301号

(72) 発明者 伊藤 義博

京都府京都市中京区御池通高倉西入高宮町  
216 グランフォルム御池402

(72) 発明者 持田 晃一

大阪府寝屋川市東香里岡町8-10

(74) 代理人 弁理士 安藤 順一 (外1名)

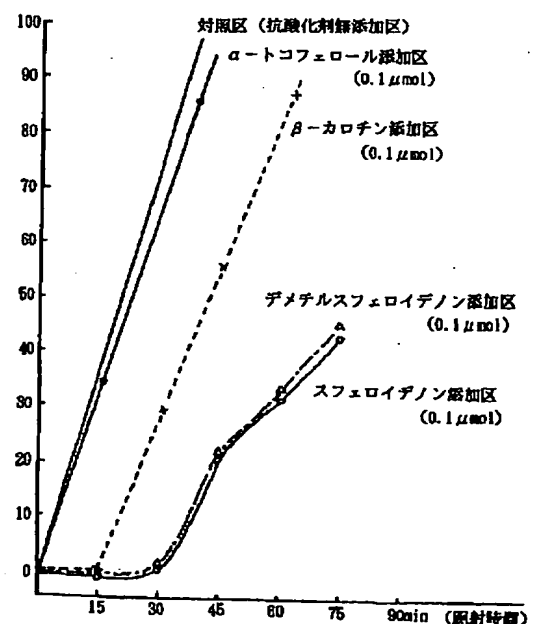
(54) 【発明の名称】 抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキス、その製造法及び抗酸化剤並びに着色料

(57) 【要約】

【目的】 食品、医薬品、化粧品に好適な安全性が高い天然由来の優れた抗酸化活性をもつ新規抗酸化剤並びに安全性が高い天然由来の鮮明な赤～赤紫色を呈する新規着色料を提供する。

【構成】 ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌（具体例 ロドバクター カプシュラタス：ATCC 11166）から抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキス、スフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンを得る。

% (リノール酸メチル過酸化物)



メチレンブルーの光照射により発生した一重項酸素による  
リノール酸メチルの過酸化反応の抑制作用

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌から有機溶媒を用いて抽出したことを特徴とする抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを。

【請求項2】 ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌が、ロドバクター カプシュラタス (ATCC 11166) である請求項1記載の抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを。

【請求項3】 ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌から有機溶媒を用いて抽出した抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを抽出源として有機溶媒を用いて抽出したことを特徴とするスフェロイデノン。

【請求項4】 ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌が、ロドバクター カプシュラタス (ATCC 11166) である請求項3記載のスフェロイデノン。

【請求項5】 ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌から有機溶媒を用いて抽出した抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを抽出源として有機溶媒を用いて抽出したことを特徴とするデメチルスフェロイデノン。

【請求項6】 ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌が、ロドバクター カプシュラタス (ATCC 11166) である請求項5記載のデメチルスフェロイデノン。

【請求項7】 請求項1又は2記載の抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスをからなる着色料。

【請求項8】 請求項3又は4記載のスフェロイデノンを有効成分とする抗酸化剤。

【請求項9】 請求項5又は6記載のデメチルスフェロイデノンを有効成分とする抗酸化剤。

【請求項10】 ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をエタノール、メタノール及びアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮することを特徴とする抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスの製造法。

【請求項11】 ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をエタノール、メタノール及びアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮し、該濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画して20%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する赤色フラクションを濃縮することを特徴とするスフェロイデノンの製造法。

【請求項12】 ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をエタノール、メタノール及びアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮し、該濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画して50%ジエチルエーテル・n

-ヘキサンで溶出する赤色フラクションを濃縮することを特徴とするデメチルスフェロイデノンの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、微生物から得られる抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを、スフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノン並びにそれらの製造法に関する。本発明に係る抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを、スフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンは、その優れた抗酸化作用から抗酸化剤として用いられると共に、その赤色～赤紫色を呈する鮮明な色彩から着色料として用いられる。従って、本発明は、食品、医薬品、化粧品等の各分野に広く利用できるものである。

## 【0002】

【従来の技術】 周知の通り、食品、医薬品、化粧品等に用いられている抗酸化剤には、ブチルヒドロキシアニソール (BHA) やブチルヒドロキシトルエン (BHT) に代表される合成系の抗酸化剤とアスコルビン酸やトコフェロールに代表される天然由来の抗酸化剤とがあるが、前者は、その安全性に問題があるので、上記各種製品の消費者が示す拒否反応が強くなりつつあるため、使用量も減少していく傾向にあり、安全性が高い後者への需要が増加しているのが現状である。

【0003】 しかも、近年、活性酸素によって生体内に生成する過酸化物が、細胞の老化、炎症、発ガン等の原因となっていることから、生体内における抗酸化的な防御機構を支援する物質として、安全性が高い天然由来の抗酸化剤が注目されている。

【0004】 また、周知の通り、食品、化粧品等に用いられている着色料は、特に、安全性が要求されているので、安全性が高い天然由来の着色料への需要が増加しているのが現状である。

【0005】 一方、従来より、光合成細菌を用いて有用物質を得る様々な技術手段が提案されている。即ち、例えば、特公昭52-7079号公報にはロドシュードモナス (Rhodospseudomonas) 属、ロドスピリラム (Rhodospirillum) 属及びクロマチウム (Chromatium) 属から抗ウイルス活性物質を得る技術が開示されており、また、特公昭47-7954号公報にはロドシュードモナス カプシュラタス (Rhodospseudomonas capsulatus: 微工研菌第879号) 菌体からユビキノン50を得る技術が、特公昭56-34278号公報には同菌体からユビキノンQ10を得る技術が、それぞれ開示されており、さらに、特公昭48-21519号公報には同菌体からコエンチームQを得る技術が開示されている。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 前記の通り、食品、医薬品、化粧品等の各分野においては、安全性が高い天然由来の抗酸化剤並びに着色料への需要が高いが、現在、

実用されている天然由来の抗酸化剤の種類は非常に限られたものであり、その使用に当って、多岐にわたる処方が組み難いという問題点がある。

【0007】また、現在、実用されている安全性が高い天然由来の着色料の種類は、上記抗酸化剤の場合に比較すれば多いが、それでも多様な変化に富む色彩を現出させるには、限界があるという問題点がある。

【0008】本発明は、上記諸問題点に鑑み、安全性が高い天然由来の新規抗酸化剤並びに新規着色料が大量に安定して供給できる技術手段の提供を技術的課題とする。本発明者等は、上記課題を達成するために、数多くの微生物を対象として系統的な研究・実験を重ねた結果、光合成細菌の一種であるロドバクター (Rhodospirillum rubrum) 属に属する菌体が優れた抗酸化活性をもつカロチノイドを産成するという刮目すべき新知見を得、本発明を完成したものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】前記技術的課題は、次の通りの本発明によって達成できる。

【0010】即ち、本発明は、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌から有機溶媒を用いて抽出した抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌から有機溶媒を用いて抽出した抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを抽出源として有機溶媒を用いて抽出したスフェロイデノン、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌から有機溶媒を用いて抽出した抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを抽出源として有機溶媒を用いて抽出したデメチルスフェロイデノンである。

【0011】また、本発明は、上記抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを抽出した着色料である。

【0012】また、本発明は、上記スフェロイデノンを有効成分とする抗酸化剤及び上記デメチルスフェロイデノンを有効成分とする抗酸化剤である。

【0013】また、本発明は、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をエタノール、メタノール及びアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮することからなる抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスの製造法、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をエタノール、メタノール及びアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮し、該濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画して20%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する赤色フラクションを濃縮することからなるスフェロイデノンの製造法及びロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をエタノール、メ

タノール及びアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮し、該濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画して50%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する赤色フラクションを濃縮することからなるデメチルスフェロイデノンの製造法である。

【0014】上記各発明におけるロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌の具体例は、ロドバクター カプシュラタス (Rhodobacter capsulatus: ATCC 11166) である。なお、ロドバクター カプシュラタス (同上) は、前掲各公報記載の各発明の出願時には「バージェイ・マニュアル・オブ・データミナティブ・バクテリオロジー 7版」に見られる通りロドシュードモナス属に分類されていたが、現在では「バージェイズ・マニュアル・オブ・システムテック・バクテリオロジーVol 3」に見られる通りロドバクター属に分類されている。

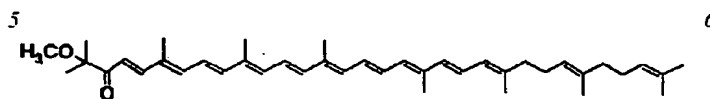
【0015】次に、本発明の構成をより詳しく説明する。本発明において用いるロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌は、周知の培養法 (例えば、前出特公昭47-7954号公報参照) によって、容易に大量培養が行える。例えばイースト エキストラクト (Yeast extract: Difco)、ポリペプトン、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$  及び水からなる培地 (pH 7.4) を用い、30~40℃で約48時間培養すれば、容易に大量の菌体が培養できる。培養した菌体の集菌、洗浄は常法に従って行えばよい。

【0016】菌体から抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを得るに当っての抽出・濃縮手段自体は常法に従って行えばよいが、抽出溶媒にはエタノール、メタノール、アセトン等の有機溶媒を用いる必要がある。なお、菌体を水で抽出しても水抽出画分には抗酸化活性は認められない。

【0017】菌体から抽出した上記カロチノイド含有エキスを抽出したスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンを得るに当っての濃縮・分画手段自体は、例えばカラムクロマトグラフィーを用いて、常法に従って行えばよいが、前者はシリカゲルクロマトグラフィーによる20%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する赤色フラクションを濃縮することにより、後者はシリカゲルクロマトグラフィーによる50%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する赤色フラクションを濃縮することによって得られる。なお、スフェロイデノン (化1) 及びデメチルスフェロイデノン (化2) の同定は、紫外・可視部吸収スペクトル、質量分析スペクトル (EI-MS) 及び水素核磁気共鳴スペクトル ( $^1H$ -NMR) によって行った。

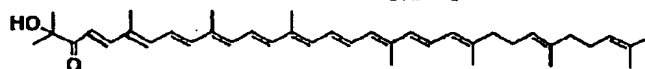
【0018】

【化1】



【0019】

【化2】



【0020】本発明に係る抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを、スフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンは、アスコルビン酸やトコフェノールを用いる場合と同様の使用態様によって、抗酸化剤として用いることができる。

【0021】また、本発明に係る抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを、天然由来の着色料（例えば、パブリカ色素やキャロットオイル等）を用いる場合と同様の使用態様によって、着色料として用いることができる。

【0022】

【作用】本発明者等は、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌のもつ抗酸化活性物質産成機構については、未だ充分解明していないが、該菌株から優れた抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを、スフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンが確実に得られることが保証できる。何故なら、本発明者等は、ロドバクター カプシュラタス (ATCC 11166) の有機溶媒抽出物に抗酸化作用が認められたので、さらに進んで該抽出物についてクロマトグラフィーによる活性物質の検索を行った結果、抗酸化活性を持つ物質としてスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンを得ているからである。

【0023】本発明に係る抗酸化活性をもつスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンの抗酸化作用は、β-カロチンのそれよりも強く、特に、一重項酸素に対する抗酸化作用は抗酸化剤としても知られているα-トコフェノールのそれよりも強い。

【0024】また、本発明に係る抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを、鮮明な赤色～赤紫色を呈しており、天然由来の着色料と同等の着色力をもっている。

【0025】

【実施例】実施例によって本発明の構成、作用を具体的に説明すれば、次の通りである。

## 実施例1

(菌株の培養) イースト エキストラクト (Difco) 0.3%、ポリペプトン 0.3%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%、 $CaCl_2$  0.03%及び水 残部からなる培養液 (pH 7.4) によって、ロドバクター カプシュラタス ATCC 11166 を、37℃で48時間培養した後、9,500rpm、5℃、10min の条件で遠心分離して、菌体を集め、該菌体を50mM MOPS (Good's buffer) pH 7.2を用いて3回洗浄した。

【0026】(抗酸化活性物質の分離) 上記のロドバクター カプシュラタス ATCC 11166 菌体 60g (湿重量) を、海砂を用いてホモジナイズした後、アセトン 1000mlを用いて2回室温で抽出し、抽出液を濾過した後、37℃で減圧濃縮して鮮明な赤紫色の抽出エキス 10g を得た。ここに得た抽出エキスは抗酸化活性をもっていた。

【0027】上記の抽出エキス 5g を、直径3cm・長さ30cmのシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いてジエチルエーテル・n-ヘキサン混合溶媒によって精密に溶出分画した。20%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出した赤色フラクションを、オクタデシルシランを固定相として20%ジクロロメタン・アセトニルによる高速液体クロマトグラフィーによって精製した後、37℃で減圧濃縮して赤色物質 6mg を得た。ここに得た赤色物質は、紫外・可視部吸収スペクトル (図1参照)、質量分析スペクトル (図2参照) 及び水素核磁気共鳴スペクトル (図3参照) の解析結果から、スフェロイデノンと同一であった。50%ジエチルエーテル・m-ヘキサンで溶出した赤色フラクションを、上記と同じ手法によって精製・濃縮して赤色物質 4mg を得た。ここに得た赤色物質を、上記と同じ手法によって検討した (図4、5、6参照) 結果からデメチルスフェロイデノンと同一であった。

【0028】(抗酸化活性の検定)

A. 脂溶性アゾ化合物AMVN: 2,2'-azobis (2,4-dimethyl-valeronitrile) により誘導されるリノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制作用 (脂質ペルオキシラジカル L<sub>OO</sub>・による脂質の過酸化抑制効果) について。対照区として、0.1Mリノール酸メチルのn-ヘキサン-2-プロパノール (1:1) v/v 溶液 1ml に 100mM AMVN の n-ヘキサン溶液 0.1ml を加え、遮光下、37℃で浸とうしながら、インキュベートする。インキュベート中の反応溶液を、経時的に10μl 宛を取り、各反応溶液について高速液体クロマトグラフィーによってリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定した。一方、0.1Mリノール酸メチルのn-ヘキサン-2-プロパノール (1:1) v/v 溶液 1ml に、あらかじめ抗酸化力を検定する物質として、ここに得たスフェロイデノンを 0.1μM 添加し、5分間インキュベートした以外は、上記と同条件によってリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定し、対照区と比較して抑制作用を検定した。また、ここに得たデメチルスフェロイデノンについても、上記と全く同様にして抑制作用を検定した。さ

らに、比較のため、 $\beta$ -カロチンについても、上記と全く同様にして抑制作用を検定した。以上の各検定結果を図7にまとめて示す。同図によって、ここに得たスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンが優れた抗酸化活性をもっていることが確認できる。なお、図8は、添加量を  $0.1\mu\text{M}$  から  $0.4\mu\text{M}$  に変更した以外は、上記と同様にして検定した結果をまとめて示したものである。同図からも、ここに得たスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンが優れた抗酸化活性をもっていることが確認できる。

【0029】B. メチレンブルーの光化学反応により誘導されるリノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制作用（一重項酸素による過酸化防止効果）について。対照区として、 $0.1\text{M}$ リノール酸メチルの  $n$ -ヘキサン-2-プロパノール（1：1） $v/v$  溶液  $2\text{ml}$  に  $0.1\text{mM}$  メチレンブルーのエタノール溶液  $2\text{ml}$  を加え、蛍光灯を照射する。照射下の反応溶液を、経時的に  $10\mu\text{l}$  宛を取り、各反応溶液について高速液体クロマトグラフィーによってリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定した。一方、 $0.1\text{M}$ リノール酸メチルの  $n$ -ヘキサン-2-プロパノール（1：1） $v/v$  溶液  $2\text{ml}$  に、あらかじめ抗酸化力を検定する物質として、ここに得たスフェロイデノンを  $0.1\mu\text{M}$  加え、浸とうして溶解した以外は、上記と同条件によってリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定し、対照区と比較して抑制作用を検定した。また、ここに得たデメチルスフェロイデノンについても、上記と全く同様にして抑制作用を検定した。さらに、比較のため、 $\beta$ -カロチン並びに $\alpha$ -トコフェロールについても、それぞれ上記と全く同様にして抑制作用を検定した。以上の各検定結果を図9にまとめて示す。同図によって、ここに得たスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンが優れた抗酸化活性をもっていることが確認できる。注目すべきは、抗酸化剤として汎用されている $\alpha$ -トコフェロールが  $0.1\mu\text{M}$  では一重項酸素による過酸化抑制効果を示さないのに、ここに得たスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンが強い抑制効果を示している事実である。

【0030】（着色力試験）ここに得た鮮明な赤紫色の抽出エキスをを用いて、次の通りの着色力試験を行った。赤紫色の抽出エキス  $0.5\text{mg}$  をエーテル  $2\text{ml}$  に溶解したところ該溶液はマンセル色度で  $5\text{R}5/10$  の色調を示した。上記溶液を白色濾紙に浸込させた後、風乾したところ、該濾紙はマンセル色度で  $5\text{R}5/10 \sim 5\text{R}5/8$  の色調に染った。この濾紙を水洗しても色落ちは殆ど認められなかった。次に、赤紫色の抽出エキス  $0.5\text{mg}$  をエーテル・エタノール（1：1） $2\text{ml}$  に溶解した後、 $0.5\%$  Tween20（商品名：界面活性剤）水溶液  $10\text{ml}$  に加えて攪拌し、さらに、この溶液を精製水  $40\text{ml}$  に加えたところ、該精製水はマンセル色度で  $5\text{R}5/10 \sim 5/8$  の色調に着色された。以上の試験結果から、ここに得た抽

出エキスが、優れた着色力をもっていることが確認できる。

【0031】なお、ここに得たスフェロイデノンを用いて、次の通りの着色力試験を行った。まず、スフェロイデノン  $0.5\text{mg}$  をエーテル  $2\text{ml}$  に溶解したところ該溶液はマンセル色度で  $5\text{R}4/12$  の色調を示した。上記溶液を白色濾紙に浸込させた後、風乾したところ、該濾紙はマンセル色度で  $5\text{R}4/12 \sim 5\text{R}5/12$  の色調に染った。この濾紙を水洗しても色落ちは殆ど認められなかった。次に、ここに得たスフェロイデノン  $0.5\text{mg}$  をエーテル・エタノール（1：1） $2\text{ml}$  に溶解した後、 $0.5\%$  Tween20（商品名：界面活性剤）水溶液  $10\text{ml}$  に加えて攪拌し、さらに、この溶液を精製水  $40\text{ml}$  に加えたところ、該精製水はマンセル色度で  $5\text{R}4/12 \sim 5/12$  の色調に着色された。

【0032】さらに、ここに得たデメチルスフェロイデノンについても上記と全く同様にして着色力試験を行ったところ、その色調及び着色力は上記スフェロイデノンのそれとほぼ同じであった。以上の試験結果から、ここに得たスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンが、それぞれ優れた着色力をもっていることが確認できる。

#### 【0033】

【発明の効果】本発明によれば、実施例にも示した通り、安全性が高い天然由来の優れた抗酸化活性をもつ新規抗酸化剤並びに新規着色料が提供できる。そして、本発明によって提供される新規抗酸化剤は、単独で使用できることは勿論、既存の天然由来の各種抗酸化剤と組み合わせることもできるから、食品、医薬品、化粧品等の各対象物に応じた多岐にわたる処方を組むことが可能となり、また本発明によって提供される新規着色料も、単独で使用できることは勿論、既存の天然由来の各種着色料と組み合わせることもできるから、多様な変化に富む色彩を現出させるとが可能となる。また、本発明に用いる菌体は、大量培養が容易に低コストをもって行えるので、各目的物を比較的安価に得ることができる。従って、本発明の産業利用性は非常に大きいといえる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るスフェロイデノンの可視部吸収スペクトル図。

【図2】本発明に係るスフェロイデノンの電子分光質量・スペクトル（EI-MS）図。

【図3】本発明に係る抗酸化活性をもつスフェロイデノンの水素核磁気共鳴スペクトル（ $^1\text{H-NMR}$ ）図。

【図4】本発明に係る抗酸化活性をもつデメチルスフェロイデノンの可視部吸収スペクトル図。

【図5】本発明に係る抗酸化活性をもつデメチルスフェロイデノンの電子分光質量・スペクトル（EI-MS）図。

9

【図6】本発明に係る抗酸化活性をもつデメチルスフェロイデノンの水素核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H-NMR}$ ) 図。

【図7】脂溶性ラジカル発生剤AMVNにより誘導されるリノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制作用を示すグラフ。

【図8】脂溶性ラジカル発生剤AMVNにより誘導されるリ

10

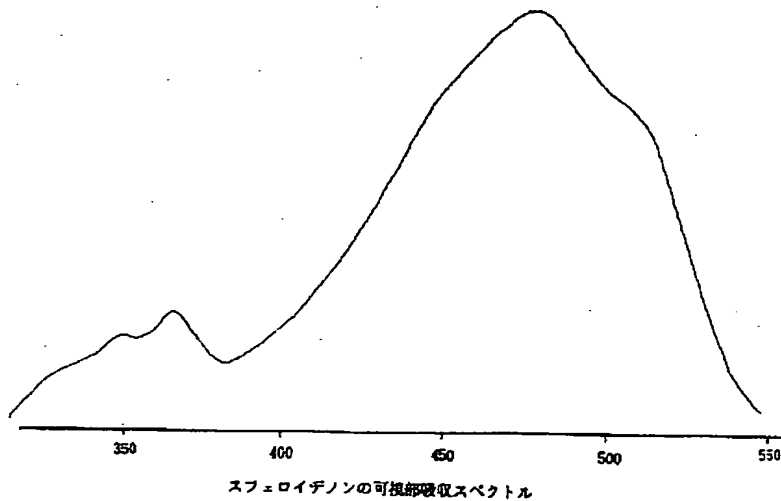
ノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制作用を示すグラフ。

【図9】メチレンブルーの光化学反応により誘導されるリノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制作用を示すグラフ。

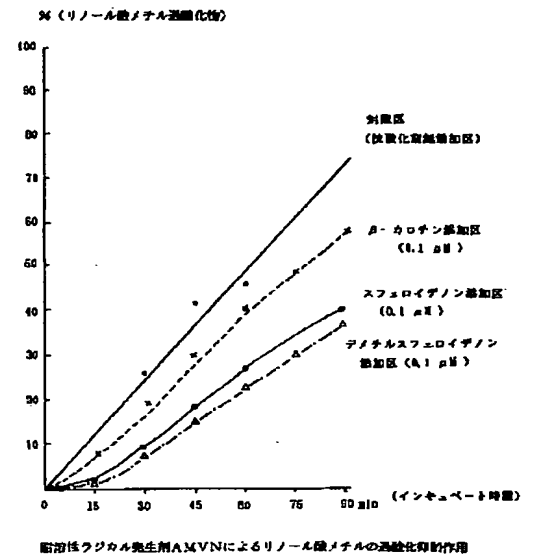
【符号の説明】

なし。

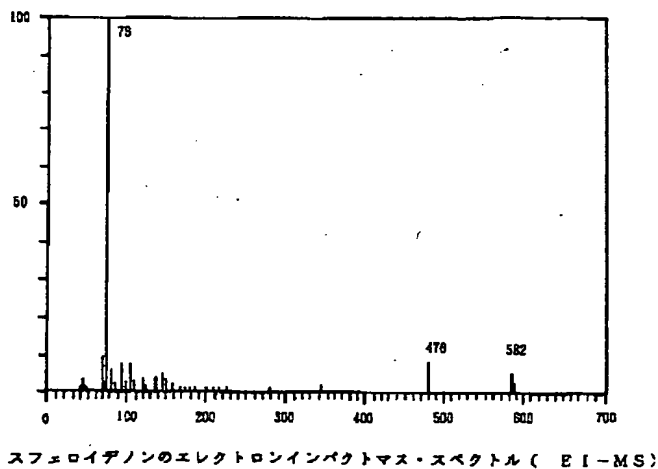
【図1】



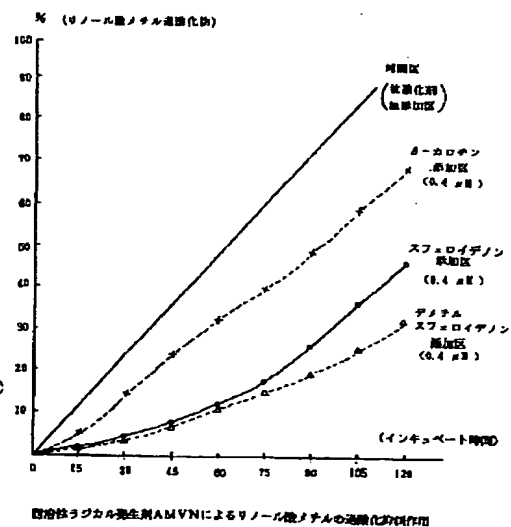
【図7】



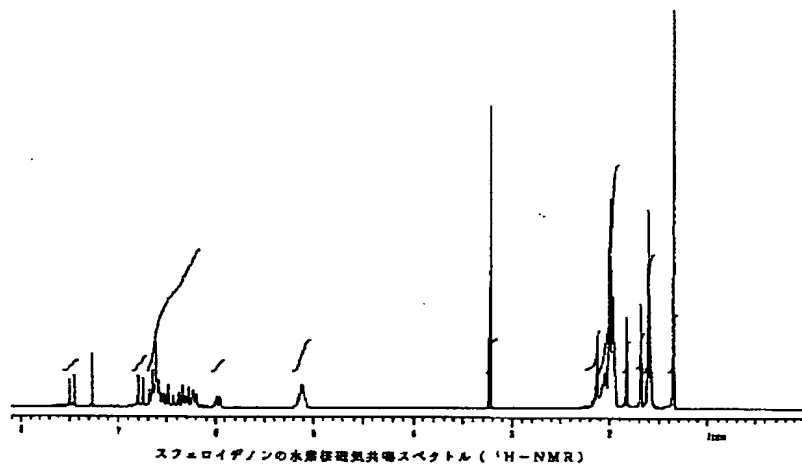
【図2】



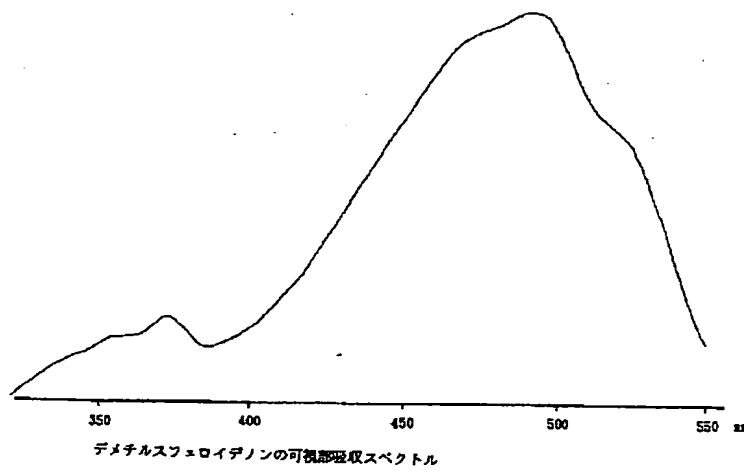
【図8】



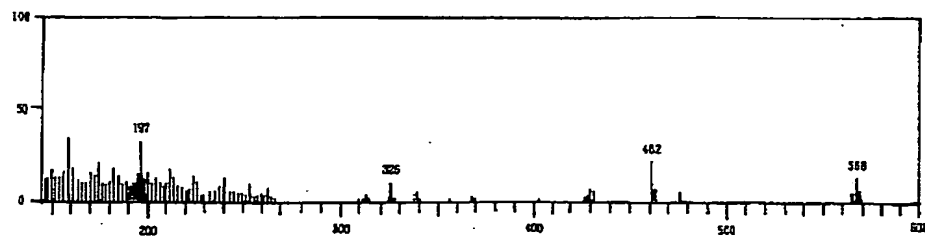
【図3】



【図4】

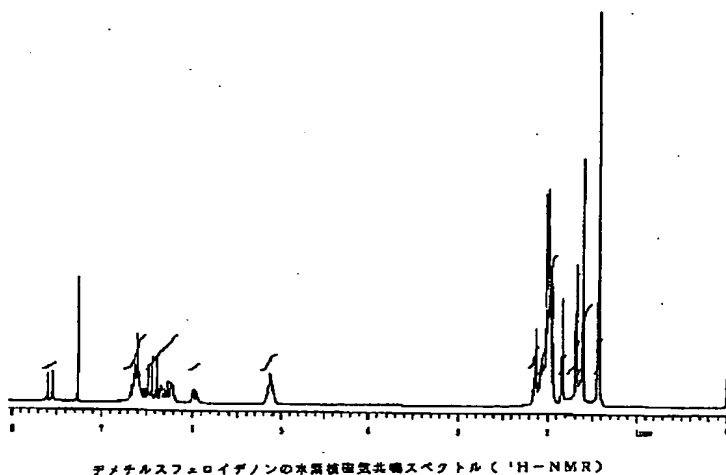


【図5】

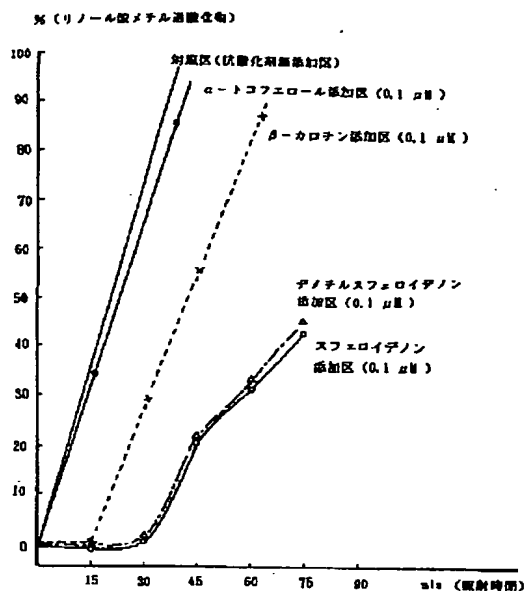




【図6】



【図9】



メチレンブルーの光照射により発生した一重項酸素によるリノール酸メチルの過酸化反応の抑制作用

## 【手続補正書】

【提出日】平成6年4月6日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】(抗酸化活性の検定)

A. 脂溶性アゾ化合物AMVN: 2, 2'-azobis (2, 4-dimethyl-valeronitrile) により誘導されるリノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制作用 (脂質ペルオキシラジカル $\text{LOO}\cdot$ による脂質の過酸化抑制効果) について。対照区として、 $0.1\text{M}$ リノール酸メチルの $n$ -ヘキサン-2-プロパノール (1:1)  $v/v$ 溶液  $1\text{ml}$  に  $100\text{mM}$  AMVN の  $n$ -ヘキサン溶液  $0.1\text{ml}$  を加え、遮光下、 $37^\circ\text{C}$  で浸とうしながら、インキュベートする。インキュベート中の反応溶液を、経時的に  $10\mu\text{l}$  宛を取り、各反応溶液について高速液体クロマトグラフィーによってリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定した。一方、 $0.1\text{M}$ リノール酸メチルの $n$ -ヘキサン-2-プロパノール (1:1)  $v/v$ 溶液  $1\text{ml}$  に、あらかじめ抗酸化力を検定する物質として、ここに得たスフェロイデノンを  $0.1\mu\text{mol}$  添加し、5分間インキュベートした以外は、上記と同条件によってリノール

酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定し、対照区と比較して抑制作用を検定した。また、ここに得たデメチルスフェロイデノンについても、上記と全く同様にして抑制作用を検定した。さらに、比較のため、 $\beta$ -カロテンについても、上記と全く同様にして抑制作用を検定した。以上の各検定結果を図7にまとめて示す。同図によって、ここに得たスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンが優れた抗酸化活性をもっていることが確認できる。なお、図8は、添加量を  $0.1\mu\text{mol}$  から  $0.4\mu\text{mol}$  に変更した以外は、上記と同様にして検定した結果をまとめて示したものである。同図からも、ここに得たスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンが優れた抗酸化活性をもっていることが確認できる。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】B. メチレンブルーの光化学反応により誘導されるリノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制作用 (一重項酸素による過酸化防止効果) について。対照区として、 $0.1\text{M}$ リノール酸メチルの $n$ -ヘキサン-2-プロパノール (1:1)  $v/v$ 溶液  $2\text{ml}$  に  $0.1$

mMメチレンブルーのエタノール溶液2mlを加え、蛍光灯を照射する。照射下の反応溶液を、経時的に10 $\mu$ l宛を取り、各反応溶液について高速液体クロマトグラフィーによってリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定した。一方、0.1Mリノール酸メチルのn-ヘキサン-2-プロパノール(1:1)v/v溶液2mlに、あらかじめ抗酸化力を検定する物質として、ここに得たスフェロイデノンを0.1 $\mu$ mol加え、浸とうして溶解した以外は、上記と同条件によってリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定し、対照区と比較して抑制作用を検定した。また、ここに得たデメチルスフェロイデノンについても、上記と全く同様にして抑制作用を検定した。さらに、比較のため、 $\beta$ -カロチン並びに $\alpha$ -トコフェロールについても、それぞれ上記と全く同様にして抑制作用を検定した。以上の各検定結果を図9にまとめて示す。同図によって、ここに得たスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンが優れた抗酸化活性をもっていることが確認できる。注目すべきは、抗酸化剤として汎用されている $\alpha$ -トコフェロールが0.1 $\mu$ molでは一重項酸素による過酸化抑制効果を示さないのに、ここに得たスフェロイデノン及びデメチルスフェロイデノンが強い抑制効果を示している事実である。

【手続補正3】

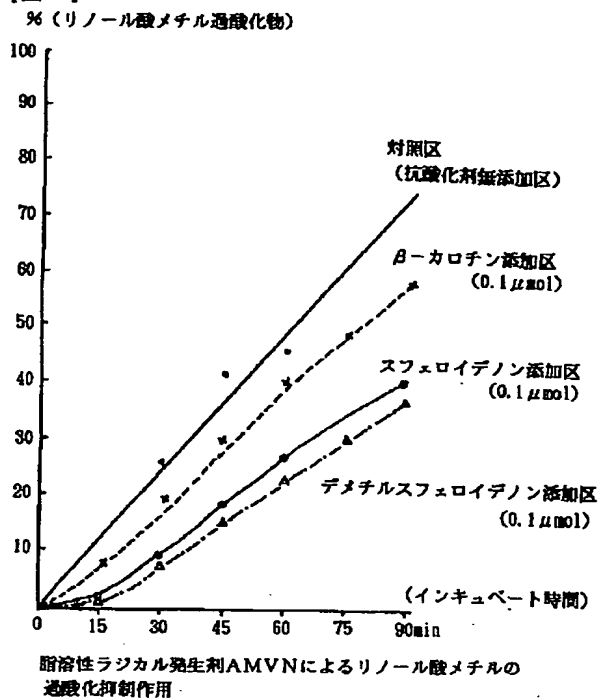
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図7

【補正方法】変更

【補正内容】

\*【図7】



【手続補正4】

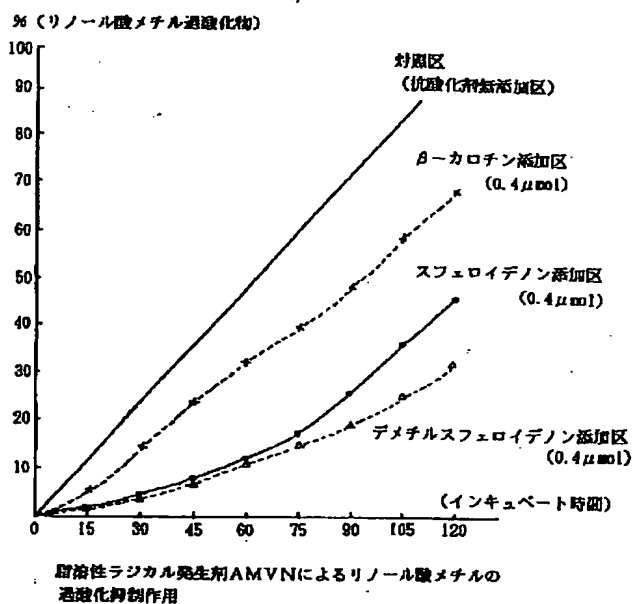
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図8

【補正方法】変更

【補正内容】

【図8】



【手続補正5】

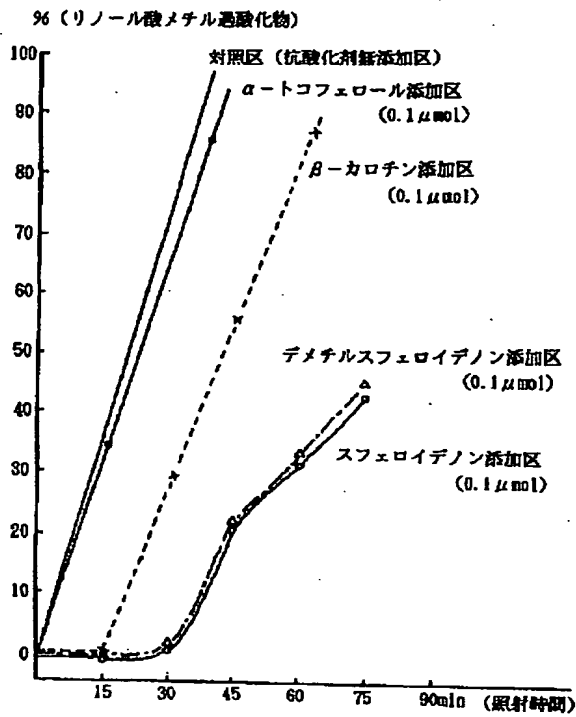
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図9

【補正方法】変更

【補正内容】

【図9】



メチレンブルーの光照射により発生した一重項酸素による  
リノール酸メチルの過酸化反応の抑制作用